

TILFELLER MED AKUTT HEPATITT A DER DET SAMTIDIG PÅVISES REAKTIVITET OVERFOR EPSTEIN- BARR-VIRUS VCA-IGM-ANTISTOFFER

PROSJEKTOPPGAVE

PROFESJONSSTUDIET I MEDISIN

BERIT BORSHEIM SØRENSEN, KULL V-01, 2006

UTFØRT VED MIKROBIOLOGISK AVDELING
AKERSHUS UNIVERSITETSSYKEHUS

Universitetet i Oslo
Det medisinske fakultet

ABSTRACT

Serum samples from 76 patients with clinical and serological (anti-hepatitis A virus IgM positive) evidence of hepatitis A were tested for antibodies to Epstein-Barr-virus (EBV). Among these sera 26 were found positive for anti-EBV-VCA-IgM, and 21 of them were positive for EBNA-1-IgG. EBV-VCA-IgM may become positive during primary or reactivated EBV-infection, by interference with rheumatoid factor (RF), by crossreactive antibodies or by EBV-induced polyclonal B-cell activation. The aim of the study was to elucidate the reasons for EBV-VCA-IgM positivity in our serum samples by a combination of additional tests and a survey of the literature.

Comparison with other tests for EBV-IgM and for EBV-IgG was performed, but did not give more conclusive results. Assessment of total-IgG showed a weak coherence with the EBV-VCA-IgM-results, whereas testing for RF did not give any additional information. The most likely reasons for the reactivity of EBV-IgM were reactivation of latent virus or IgG/RF-interference.

Assessment of VCA-IgM, VCA-IgG and EBNA-1-IgG in the serum sample is important for differentiation between primary and reactivated EBV-infection. For a correct diagnosis, relevant assays have to be chosen, based on a good medical history and a thorough medical examination. It is also important to know something about the epidemiology of the disease in the population. Furthermore, the sensitivity and specificity of the tests have to be considered, and thereby the validity of the results.

SAMMENDRAG

Serumprøver fra 76 pasienter med kliniske og serologiske (hepatitt A-virus IgM-antistoff positive) funn forenlige med hepatitt A ble testet for antistoffer mot Epstein-Barr-virus (EBV). Av disse ble 26 sera positive for EBV-VCA-IgM, og 21 av dem var positive for anti-EBNA-1 IgG. EBV-VCA-IgM kan bli positiv ved en primær eller reaktivert EBV-infeksjon, ved interferens med rheumatoid faktor (RF), ved kryssreagerende antistoffer, eller en EBV-indusert polyklonal B-celle-aktivering. Målet med oppgaven var å belyse årsakene til EBV-VCA-IgM-positiviteten i våre serumprøver ved en kombinasjon av tilleggstester og litteratursøk.

Sammenligning med andre tester for EBV-IgM og for EBV-IgG ble gjort, men det ga ikke mer konklusive resultater. Undersøkelse for total IgG i serum viste en svak sammenheng med EBV-VCA-IgM-resultatene, mens testing for RF i serum ikke ga noen tilleggsinformasjon. De mest sannsynlige årsakene til reaktiviteten for EBV-IgM var reaktivering av latent virus eller IgG/RF-interferens.

Testing for VCA-IgM, VCA-IgG og EBNA-1-IgG i serumprøven er viktig for å skille mellom en primær EBV-infeksjon og reaktivering. For korrekt diagnose må relevante analyser velges på grunnlag av en god anamnese og en grundig klinisk undersøkelse. Det er også viktig å ha kjennskap til sykdommens epidemiologi i populasjonen. Videre må testenets sensitivitet og spesifisitet vurderes, og dermed utsagnsverdien av resultatene.

INNLEDNING

Det er et kjent problem at testing for IgM-antistoffer kan gi falske positive resultater. Man har sett reaktivitet for IgM-antistoffer mot Epstein-Barr-virus (EBV) ved blant annet cytomegalovirus (CMV)-infeksjon (1) og andre infeksjoner (2), og reaktivitet i ulike EBV-viruskapsid-antigen IgM (EBV-VCA-IgM)-tester som skyldes tilstedeværelse av rheumatoid faktor i serumprøven (3, 4). Ved Mikrobiologisk avdeling ved Akershus Universitetssykehus ble det observert overraskende mange prøver med positivt resultat både for IgM-antistoffer mot hepatitt A virus og mot EBV-VCA. Årsaken til at det ble tydeligere var utbruddet av hepatitt A-infeksjoner på slutten av 1990-tallet som medførte at mange prøveresultater ble vurdert i løpet av et kort tidsrom. I tilfeller der angitte kliniske opplysninger dreide seg om mer generelle symptomer og funn som magesmerter, icterus eller forhøyede leverenzymverdier, ble prøvene testet med hensyn på flere mulige agens som kan gi dette. Mange prøver ble dermed undersøkt for både HAV-IgM og for EBV-VCA-IgM i tillegg til hepatitt B, hepatitt C og CMV.

I starten av perioden ble Paul-Bunnell-Davidsohns test for heterofile antistoffer den testen som rutinemessig ble brukt ved laboratoriet ved spørsmål om primær EBV-infeksjon, og vi supplerte med en EBV-VCA-IgM-test i tilfeller der vi var usikre på validiteten av negativt resultat av Paul-Bunnell-testen. Halvveis i perioden sluttet vi å utføre testing for heterofile antistoffer, og brukte primært EBV-VCA-IgM-testen. Etter noen måneder startet vi så med å supplere med VCA-IgG når VCA-IgM ble positiv. Vi utførte ikke testing for EBNA-IgG på den tiden.

Jeg ønsker å belyse mulige årsaker til de positive EBV-VCA-IgM-resultatene. Klinisk bilde og anamnese hos disse pasientene tyder på akutt hepatitt A-infeksjon, dermed stiller jeg spørsmålstegn ved hvorvidt resultatene av EBV-IgM er sanne, og ønsker også å se nærmere på det. I tillegg vil jeg vurdere det diagnostiske verktøy som brukes ved laboratoriet for å få en mest mulig korrekt diagnostikk med hensyn på aktuell primær EBV-infeksjon.

I tidsrommet fra januar 1998 til april 1999 ble det påvist HAV-IgM-antistoff i serumprøver fra 76 pasienter. 38 av dem ble rutinemessig testet for EBV-VCA-IgM og 18 av dem ble positive for dette.

Mulige årsaker til at serumprøvene blir positive for EBV-VCA-IgM:

- Personene har en aktuell eller nylig gjennomgått primær Epstein-Barr-virus-infeksjon.
- Det foreligger en reaktivering av latent EBV hos personer som tidligere har hatt en primær infeksjon med dette.
- Det foreligger en polyklonal aktivering av B-celler.
- Det foreligger kryssreaksjon eller andre uspesifikke reaksjoner
 - Med HAV-antistoffer.
 - Med rheumatoid faktor (RF) og EBV-VCA-IgG
 - Med andre uspesifikke faktorer
- Reagensene kan være for dårlige:
 - Antigenet som testbrønnene er dekket med er ikke rent nok.
 - Cutoff i testen er satt for lavt.

- Man får ikke absorbert bort alt EBV-VCA-IgG.

HEPATITT A-VIRUS

Hepatitt A-virus (HAV) er et hepatovirus som tilhører familien picornaviridae. De er positivt enkelttrådede RNA-virus uten membran som danner runde eller kubiske partikler med diameter 27 nm. Nukleinsyren består av ca 7500 nukleotider. Genomet koder for et polyprotein som spaltes til fire strukturelle proteiner, VP1-4 (5). Alle picornavirus har et ikosaedrisk kapsid, det vil si at de har en fast form som består av 20 triangulære flater arrangert rundt en rund overflate. Det er for picornavirus et såkalt triangulært T=3-kapsid som er bygd opp av 60 like proteingrupper som hver består av de strukturelle proteinene VP1-3 (6). Virus multipliserer i vertscellens cytoplasma, og frigjøres ved at cellen lyseres.

Det er identifisert fire genotyper av HAV hos mennesket, men kun en serotype. Viruset er svært stabilt, det er eter-resistent, stabilt ved lav pH og relativt resistent mot varme, men kan inaktiveres ved koking i 5 minutter og ved klorbehandling. Viruset kan også inaktiveres ved UV-stråling (6b).

Infeksjon

Smitte skjer vanligst fekal-oral, og inkubasjonstiden er fra ti til femti dager, avhengig av inokulatets størrelse. Virus skilles ut i store mengder i fæces fra ca to uker før sykdomsutbrudd, men utskillelsen avtar deretter betydelig. Den varer sjelden mer enn to uker etter at ikterus oppstår, og smittefaren er oftest liten etter sykdomsutbrudd. Smitte kan også skje ved blodsmitte i den viremiske fasen, f.eks hos stoffmisbrukere og hos homoseksuelle, særlig menn. Infeksjon fører ikke til kronisk sykdom eller bærertilstand (5).

Patogenese

Morfologisk sees nekrose av leverens parenkymceller, særlig ved portaområdet, samt infiltrasjon av betennelsesceller. Skaden medfører økt utskillelse av leverenzymmer til blod. Celleskaden oppstår etter at den maksimale virusproduksjon er over, og samtidig med produksjon av antistoff og infiltrasjon av lymfocytter. Det kan tyde på at celleskaden i hovedsak medieres via immunresponsen og ikke skyldes viral cytopatogen effekt (5).

Klinikk

Klinisk starter infeksjonen ofte med kvalme, oppkast, myalgier og hodepine, eventuelt feber og som regel uttalt slapphet. Etter 2 – 7 dager får pasienten avfarget fæces og mørk urin, og utvikler så ikterus. I denne perioden er ofte leveren øm og forstørret. Sykdommen varer omtrent like lenge som ikterus, og bedring kommer gjerne etter 2 – 6 uker, men slapphet kan vedvare i 3 – 4 måneder. Barn får gjerne lette generelle symptomer, eller subklinisk infeksjon. Fulminant hepatitt er svært sjelden, og letaliteten er 0,3 % eller lavere, høyest hos eldre (5).

Diagnostikk

Klinisk kan det ikke skilles mellom ulike former for hepatitter. IgM-antistoffer er som regel påvisbare ved sykdomsutbruddet, de stiger raskt og når maksimale titere i løpet av en til to uker, og kan påvises opptil tre til seks måneder etter utbrudd. IgG-antistoffer dannes ca en uke senere, vedvarer trolig livet ut, og beskytter mot ny infeksjon. De kan også påvises etter aktiv immunisering. Virus kan påvises i fæces ved immunoelektronmikroskopi eller antigenpåvisning med EIA eller RIA, men da virusutskillelsen som regel er lav ved

sykdomsutbrudd kan det bare påvises hos ca 20 % av pasientene. Virusisolering er en usikker metode da HAV ikke induserer cytopatogen effekt i cellekultur (5).

Epidemiologi, profylakse og behandling

Sykdommen er høyendemisk i tropiske og subtropiske land, og i utviklingsland smittes de fleste som barn. I Norge var den også utbredt før andre verdenskrig, men etter krigen har det vært en sterk nedgang i årlig insidens, og den har ligget på 100 – 300 pr år med unntak av utbruddet på slutten av 1990-tallet, som særlig omfattet mange i stoffmisbrukermiljøet og i homofile miljøer (7). Insidensen steg da fra 335 i 1997 til 1001 i 1999 og falt tilbake til 86 i 2001 og 75 i 2002 (8). Det foreligger bestemmelser om varslings- og meldingsplikt til kommunelegen, MSIS (Meldingssystem for smittsomme sykdommer) eller sykehushygienisk enhet ved Nasjonalt Folkehelseinstitutt, avhengig av situasjonen.

De viktigste smitteforebyggende tiltak er de som fremmer god hygiene alt fra håndvask til rent drikkevann og et sikkert kloakksystem. Smittefare er størst i inkubasjonsperioden, og det gjør kontroll av smittespredning vanskelig. Personer med påvist sykdom som arbeider med næringsmidler, med visse grupper av pasienter eller med spedbarn bør ikke være i ordinært arbeid første uken etter sykdomsframbrudd. Vaksine anbefales ved reise til endemiske områder, dvs. land utenom Vest-Europa, Kanariøyene, Nord-Amerika, Japan, Australia og New Zealand. Særlig barn bør vaksineres, da de ofte har subklinisk infeksjon, og kan bli smitekilder i nærmiljøet etter hjemkomst. Vaksinasjon med én dose gir beskyttelse i ca ett år, og to doser beskytter i minst 10 år. Passiv immunisering med normalt immunglobulin gir god beskyttelse i ca 5-6 måneder. Selve infeksjonen hindres ikke, men den blir subklinisk eller lett, med lavere utskillelse av virus i fæces slik at smittefaren avtar betydelig. Posteksposisjonelt har dette også effekt, hvis det gis innen ca 10 dager (7).

Behandling er kun symptomatisk.

EPSTEIN-BARR-VIRUS

Epstein-Barr-virus (EBV) er et medlem i familien Herpesviridae, subfamilie Gammaherpesvirinae. Det er et dobbeltrådet DNA-virus, og genomet koder for ca 70 proteiner via åpne leserammer. Nukleinsyren på 184 kilobasepar er omgitt av et ikosaedrisk kapsid, og det er igjen omgitt av en lipidmembran. Herpesvirus replikerer i cellekjernen, og bruker kjernemembranen som sete for samling til nye viruspartikler. Overflateproteinene i membranen går gjennom en posttranslatorisk modifikasjon, for eksempel proteolytisk spalting, glykosylering og fosforylering. De transporteres deretter i vakuoler til celleoverflaten, og frigjøres der. Dermed er kjernemembranen en viktig bestanddel av virusmembranen (6). Membranen er av vesentlig betydning for infektiviteten.

Noen virusproteiner som assosieres med latent infeksjon (10):

- EB viral nuclear antigens (EBNA) består av seks ulike proteiner. De finnes i kjernen av den EBV-infiserte cellen. EBNA-1 er trolig nødvendig for vedlikehold av den episomale formen i den infiserte cellen, og det starter produksjonen av EBNA-2. EBNA-2 aktiverer visse cellulære gener og bidrar til å starte immortaliseringsprosessen. EBNA3A, EBNA3B og EBNA3C hemmer denne aktiveringen, slik at likevekten opprettholdes. EBNA-LP forsterker immortaliseringen.

- Latent membrane proteins (LMP). LMP-1 oppregulerer ekspresjonen av vekstfaktorreseptorer i forbindelse med immortaliseringsprosessen. LMP2A bidrar i å hemme aktiveringen av infiserte B-celler. Lytisk viral replikasjon hemmes dermed, og celleoverlevelse og latent infeksjon fremmes.

Noen virusproteiner som produseres i lytisk syklus (10):

- EBV glykoproteiner deltar i viral infektivitet og spredning. Mange av dem sitter i membranen (membrane antigens, MA) i infiserte celler. EBV binder seg til EBV-reseptoren CD 21 på B-lymfocytter ved hjelp av gp340/220. Nøytraliserende antistoffer kan nøytralisere virus og hindre infeksjon. Noen glykoproteiner medierer fusjonen mellom viral og cellulær membran og viral penetrasjon ved at det bindes til HLA klasse II i B-cellens membran.
- Visse proteiner produseres når "immediate-early genes" (BZLF-1, BRLF-1) aktiverer "early genes" slik at det skjer en overgang fra latent til lytisk infeksjon i B-cellene.
- Early antigens (EA) kodes av "early genes" som bare uttrykkes i infiserte celler som er i lytisk syklus. Det medfører at antistoffer mot disse proteinene både kan påvises ved primær infeksjon og reaktivering av virus fra latent infiserte celler. De fleste av disse proteinene har enzymatiske funksjoner som trenges for viral DNA-replikasjon. De deles i to komponenter (EA-R og EA-D) som fordeles ulikt i cellene.
- Viral capsid antigens (VCA) kodes av "late genes", og de utgjør de strukturelle komponentene i viruskapsidet. Kapsidet produseres i den infiserte cellen sent i lytisk syklus, og antistoffer mot dette kan også påvises både ved primær infeksjon og reaktivering.

Infeksjon

Smitte skjer ved at EBV skilles ut i halssekret og overføres ved direkte og indirekte kontaktsmitte. EBV infiserer organismen via munnen, og farynksepitelceller og B-lymfocytter blir infisert (9). Det diskuteres hvorvidt lymfocytene infiseres via epitelceller i farynks, noen undersøkelser har vist at B-lymfocytene der er de celler som primært infiseres (11). Inkubasjonstiden er ca 30-50 dager. Etter gjennomgått infeksjon kan virus skilles ut i halssekret i over et år, og en antar at EBV i farynksepitel ofte reaktiveres slik at virus alltid finnes i halssekret hos en stor del av befolkningen (9).

Patogenese

Virus replikerer i B-lymfocytter og farynksepitelceller, ved at det binder seg til visse reseptorer på celleoverflaten ved hjelp av proteiner i virusmembranen (gp350). CD21 som er en cellemembranreseptor for komplementfaktor 3d, er også reseptor for EBV. B-lymfocytter og epitelceller er permissive for EBV, det vil si at cellen tillater komplett reproduksjon av virus. I B-lymfocytter kan EBV gi to typer infeksjoner. Den ene er en latent infeksjon der virusgenomet foreligger i en episomal form i de infiserte cellene. Episomet replikerer og en del viruspartikler produseres like etter infeksjonen, deretter blir det liggende i cellekjernen og replikerer sammen med cellulært DNA. Det dannes proteiner som fører til at cellen immortaliseres, apoptosen blokkeres og celleproliferasjon blir indusert. Den andre typen er en lytisk infeksjon som også kan oppstå ved aktivering av latent infiserte celler. Uspesifikk infeksjon av B-lymfocytter medfører ofte en polyklonal aktivering av disse med økt produksjon av ulike immunoglobuliner, blant annet en rekke autoantistoffer som rheumatoid faktor, antinukleære antistoffer, kuldeagglutiner med flere (9,10).

Klinikk

Vanligvis er infeksjonen asymptomatisk eller den har ukarakteristiske, lette symptomer, særlig hos barn. Ungdommer og unge voksne utvikler ofte et mononukleosebilde med lymfadenitt, tonsillene blir hovne og pussbelagte, og faryngitt, splenomegali og tegn på leveraffeksjon kan finnes. Feber og uttalt slapphet er vanlig. Hematologisk sees leukocytose der opptil 80 % av leukocytene er mononukleære. De fleste av disse er T-celler med spesifisitet for EBV-antigener på overflaten av infiserte B-celler. Symptomene avtar som regel etter et par uker, men slappheten kan vedvare i flere uker og måneder. Komplikasjoner som ofte sees er bakterielle superinfeksjoner i halsen, og allergisk hudreaksjon hvis pasienten behandles med aminopenicilliner (12). Meget sjelden kan man se luftveisobstruksjon, pneumoni, meningoencefalitt, trombocytopenisk purpura, myokarditt, nefritt, Guillain Barré's syndrom og miltruptur. I sjeldne tilfeller kan det utvikle seg en kronisk EBV-infeksjonssykdom, enten kronisk tretthetssyndrom eller et vedvarende mononukleosebilde med lymfadenopati. Barn med medfødt T-cellededefekt kan utvikle alvorlig sykdom med letalt utfall. Ved ervervet nedsatt celleformidlet immunitet som ved HIV-infeksjon og organtransplantasjon starter EBV-infiserte B-celler å replikere, og kan gi lymfoproliferativ sykdom. AIDS-pasienter kan dessuten utvikle oral hairy leukoplakia som skyldes EBV-replikasjon i epitelceller på tungen. Burkitts lymfom består av lymfoblastoide celler hvor EBV spiller en rolle. Ved nasofaryngealt karsinom er også EBV en viktig medvirkende faktor (9,10).

Diagnostikk

Mononukleose diagnostiseres vanligvis ved det typiske kliniske bilde samt påvisning av atypiske lymfocytter i blodutstryk og av heterofile antistoffer. Heterofile antistoffer er uspesifikke IgM-antistoffer rettet mot ikke-humane antigener, og de kan påvises ved at de bl.a. agglutinerer heste-erytrocytter. Tidligere ble Paul-Bunnell-Davidsohns test brukt til påvisning av disse, men etter hvert har en mer gått over til latex-agglutinasjonstester. Heterofile antistoffer kan som regel påvises i løpet av de første tre uker etter sykdomsfrembrudd, og er påvisbare i flere måneder, iblant opptil et år. Disse antistoffene påvises imidlertid ofte ikke hos små barn (13,14), og kan også mangle hos voksne over 25-årsalder med primærinfeksjon. Sensitiviteten til disse testene er dermed variabel. Spesifisiteten til testene for disse antistoffene har vært vist å være god (15), men blir dårligere med økende alder hos pasienten (14). Enkelte ganger kan den falske positiviteten skyldes at de heterofile antistoffer kan påvises i så lang tid etter gjennomgått infeksjon med EBV.

De EBV-spesifikke antistoffer som vanligst søkes påvist er IgG- og IgM-antistoffer rettet mot VCA eller EA, samt EBNA-IgG. Metodene som brukes i rutinediagnostikk er som regel ELISA-baserte, mens immunfluoresensteknikk ofte betraktes som en "gullstandard", og brukes mest i forskningssammenheng og til å validere nye tester. VCA-IgM og VCA-IgG er som regel påvisbare ved sykdomsfrembrudd. IgM-responsen varer som regel fra en til tre måneder, noen ganger lenger, og IgG kan påvises resten av livet (16). Forekomst av VCA-IgG sier ikke noe om infeksjonstidspunktet, men det kan være nyttig å undersøke aviditeten til påvist VCA-IgG. Den er lav i sykdommens akutte fase, men stiger over et tidsrom på noen måneder, og hvis en høy andel av antistoffene har lav aviditet, tyder det på nylig gjennomgått primær infeksjon (17). Hos små barn kan iblant ikke spesifikk IgM måles (18). Det meste av det anti-EBNA som dannes i løpet av de første tre måneder er mot EBNA-2. Derfor er tilstedeværelse av anti-EBNA-1 en bedre indikator på tidligere gjennomgått infeksjon enn total-anti-EBNA (19). En studie viser at anti-EBNA i enkelte tilfeller kan påvises allerede innenfor 2 uker etter sykdomsdebut, men det er ikke spesifisert om det der er testet for EBNA-1 eller EBNA-2 (19b). Enkelte immunkompromitterte pasienter kan ha avtagende eller ikke påvisbart nivå av anti-EBNA. IgG- og IgM-antistoffer mot EA kan som regel påvises ved primærinfeksjon, men sees også hyppig ved reaktivering av EBV (20).

Epidemiologi, profylakse og behandling

Seropositivitet øker med alderen, og ligger rundt 90 % hos voksne. En norsk undersøkelse viser en prevalens på ca 95 % (21). To aldersgrupper dominerer med hensyn til serokonversjon, en i 1-6-årsalder og en i 14-20-årsalder. Primærinfeksjon opptrer senere i livet i høyere sosioøkonomiske grupper, og i utviklingsland er over 90 % seropositive i 2-årsalder. Burkitts lymfom er endemisk i malariabeltet i Afrika, og en type nasofaryngealt karsinom er utbredt i sørøst-Asia.

Effektiv vaksine finnes ikke ennå, og vi har heller ikke noen antivirale midler som kan påvirke sykdomsforløpet.

RHEUMATOID FAKTOR (RF)

RF er autoantistoffer rettet mot eget IgG. De produseres i organismen blant annet ved mange infeksjonssykdommer. Mye tyder på at RF kan forsterke humoral immunrespons mot visse mikroorganismer, og dessuten fremme eliminasjonen av IgG immunkomplekser. De kan også ha en mulig rolle når det gjelder bearbeiding av antigen i visse B-lymfocytter, særlig antigener som er bundet i immunkomplekser. RF spiller også en rolle ved B-celle-maligniteter og autoimmunsykdommer som rheumatoid artritt (22). Det er hevdet at de ofte finnes ved akutte virale hepatitter (23), det er bl.a. antydnet at de kan påvises med høyt titer ved ca 25 % av tilfeller med akutt viral hepatitt (24).

RF av IgM-type kan gi falsk positiv reaksjon i en IgM-test hvis pasientserum inneholder IgG av samme spesifisitet som det IgM det testes for (25, 26). Dette skjer ved at spesifikt IgG bindes til det kjente antigenet i testen, deretter bindes RF-IgM til dette. Til slutt bindes konjugatet i testen hvis det er av typen anti-humant IgM, og enzymet i konjugatet gir en reaksjon som fører til et (falskt) positivt resultat i testen.

MATERIALE OG METODER

Prøvemateriale

Serumprøver fra 76 pasienter (alder 3-71 år, median 31 år) er undersøkt i tidsrommet januar 1998 – april 1999. De fleste av prøvene er tatt poliklinisk og sendt til laboratoriet på ulike måter. De er analysert fortløpende på de aktuelle analyser som velges ut ifra de kliniske opplysninger som er angitt på henvisningen. De fleste av disse hadde opplysninger som f. eks. icterus, forhøyede leverenzymmer, spørsmål om hepatitt, stoffmisbruk, symptomer fra lever/milt/abdomen for øvrig. Ingen av dem hadde entydig mistanke om mononukleose. Jeg valgte å ikke gå tilbake til remissene for å samle disse opplysningene, da de oftest var kortfattede og litt tilfeldige, og det ville bli vanskelig å klassifisere dem på en måte som ville gi noen verdi. Samtidig som prøven fordeles i laboratoriet til de ulike analysene, fryses ”overskuddsserum” ned i polystyrenrør og oppbevares ved – 20 °C. Fryserørene ble brukt ved kjøring av alle analyser som ikke tidligere var utført på testpanelet. De ble tint kun én gang i denne anledning, og oppbevart på kjølerom i ca. en uke mens testingen pågikk.

Analyser

- HAV-IgM, (MEIA, AxSYM, Abbott). Testen har et EIA-prinsipp applisert på antigendekkede mikropartikler som er utført med AxSYM helautomatisk analysemaskin. Mikropartiklene er dekket med antistoffer mot humant IgM som bindes til HAV-IgM i serumprøven, og det brukes et konjugat som består av

monoklonalt anti-HAV (mus) koblet til alkalisk fosfatase. Det oppgis en spesifisitet på 100 % og en sensitivitet på 99,59 %. (27).

- EBV-VCA-IgM (ELISA, Gull laboratories). Reaksjonsbrønnene er her dekket med rensset EBV-VCA gp 125 fra P3HR-1-celler. Dette antigenet binder VCA-antistoff i serumprøven. Serumfortynningsbufferen inneholder anti-humant IgG for å hindre interferens med IgG og rheumatoid faktor. Nøytraliseringen av VCA-IgG letter også tilgjengeligheten for VCA-IgM til bindingspunktene i brønnen. Konjugatet er anti-human IgM (geit) koblet til alkalisk fosfatase. Avlest verdi av en brønn som er behandlet som en prøvebrønn, men uten tilsatt serum, trekkes fra prøvenes verdier. Det angis en relativ spesifisitet på 100 % og en relativ sensitivitet på 99,4 % sammenlignet med Gull EBV-IgM IFA, og en relativ spesifisitet på 98,3 % og en relativ sensitivitet på 97,4 % sammenlignet med Dupont EBV-IgM ELISA (28).
- EBV-VCA-IgG (ELISA, Gull laboratories). Reaksjonsbrønnene er dekket med EBV-VCA gp 125 fra P3HR-1-celler. Konjugatet er anti-human IgG (geit) koblet til alkalisk fosfatase. Det angis en relativ sensitivitet på 96,7 % og en relativ spesifisitet på 95,7 % sammenlignet med Gull EBV-IgG IFA (29).
- EBNA-1-IgG (ELISA, Gull laboratories). Reaksjonsbrønnene er dekket med rekombinant antigen som svarer til C-terminal del av EBNA-1-genet (uten IR3). Konjugatet er anti-human IgG (geit) koblet til alkalisk fosfatase (30).
- Rheumatoid faktor (Latex agglutinasjon, Dade Behring). Testreagenset består av en vandig suspensjon av polystyrenpartikler som er dekket med humant gammaglobulin. Reaksjonen foregår på en plastplate. Grense for deteksjon er angitt av produsenten til ≥ 20 IU/ml, men det som detekteres er totalt RF, ikke bare IgM type (31).
- Total-IgG (Nefelometri, Dade Behring). Variasjonskoeffisient er oppgitt å være for et normalserum: 2,1 % intra-assay (gjennomsnittsverdi 13,48 g/l) og 2,7 % inter-assay (gjennomsnittsverdi 13,17 g/l) (32).
- EBV-IgM (ELISA, Enzygnost® Dade Behring). Testen påviser IgM-antistoffer mot VCA-, EA- og EBNA. Denne testen har to reaksjonsbrønner for hver prøve, hvorav den ene er dekket med VCA, EA og EBNA fra EBV-infiserte lymfoblastoide cellelinjer hvor virussyntese er stimulert, mens den andre brønnen er dekket med såkalt kontrollantigen (CoAg) fremstilt av de samme cellelinjer, men hvor virussyntesen er hemmet. Verdien som korrelerer til reaktivitet er differansen mellom avleste verdier for disse brønnene. RF-absorbenten som tilsettes ved fortynning av serumprøven bindes til humant IgG Fc-fragment, og dette komplekset binder rheumatoid faktor i prøven. Konjugatet er anti-humant IgM (geit) bundet til peroksidase. Det er angitt en sensitivitet for testen på 97,3 %, og en spesifisitet på 99,5 %. (33)
- EBV-IgG (ELISA, Enzygnost® Dade Behring). Testen påviser IgG-antistoffer mot VCA-, EA- og EBNA. Reaksjonsbrønnene er dekket med antigen/kontrollantigen på samme måte som for EBV-IgM. Konjugatet er anti-humant IgG (kanin) som består av Fab'-komponenten bundet til peroksidase. Angitt sensitivitet er 92 % og spesifisitet 100 %. (34)

EBV-VCA-IgM, EBV-VCA-IgG, EBNA-IgG med tester fra Gull Laboratories, samt EBV-IgM-testen, IgG-testen og test for rheumatoid faktor fra Dade Behring ble utført i henhold til de prosedyreforskrifter som er anført i pakningsvedlegg i reagenspakkene (27, 28, 29, 30, 31, 33, 34). Alle testene ble avpipettert og fortynnet manuelt. Enzygnost-testene ble videre analysert med Behring ELISA-processor III. De andre analysene ble kjørt manuelt. Til Gull-analysene ble platevasker Dynatech MRW brukt, og absorbansen ble avlest med Hamilton HR 7000. Total-IgG ble analysert ved klinisk kjemisk avdeling ved Ahus.

Litteratursøk

Jeg søkte i Medline/Pubmed på ordene hepatitis A, HAV, Epstein-Barr-virus, EBV, cross-reactions, immunosuppression og kombinasjoner av disse, samt lett i referanser i de artiklene som var relevante, og i pakningsvedleggene til testene jeg brukte.

Statistiske betrakninger

Sensitiviteten til en test sier hvor god testen er til å finne den substansen som det testes for. Den beregnes ved å teste et antall prøver som defineres som "sanne" positive ved at de også undersøkes med en såkalt "gullstandard". Sensitiviteten finnes ved å beregne andelen positive resultater man får med testen som prøves ut. Spesifisiteten for en analyse sier hvor god den er til å påvise sanne negative prøver. Den finnes ved å beregne andelen negative resultater i en gruppe kjente negative prøver. Konkordansen for to tester som sammenlignes kan beregnes ved å ta summen av de prøvene som blir positive med begge testene og de som blir negative med begge testene og dividere på antall prøver som er testet. Positiv prediktiv verdi for en test sier hvor stor sannsynlighet det er for at en positiv test indikerer sykdom ved en gitt prevalens av sykdommen i en populasjon. Den uttrykker andelen syke blant alle med positiv test.

HENSIKTEN MED ANALYSENE

HAV-IgM.

Kriteriet for utvelgelse av testpanel er at denne testen er positiv, det vil si at alle serumprøver som er funnet positive ved laboratoriet i det gitte tidsrom er med i testpanelet.

EBV-VCA-IgM.

De prøvene i testpanelet som ennå ikke er testet for EBV-VCA-IgM ønsker jeg å teste for dette for å se om den prosentvise andelen av falske positive er den samme i hele gruppen av pasienter med hepatitt A-sykdom, som i den gruppen der ikke hepatitt A var tydelig mistenkt før analyse i rutinen.

EBV-VCA-IgG.

Jeg ønsker å undersøke alle prøvene i testpanelet med denne testen for å vurdere sannsynligheten for at pasientene med sera som er positive for EBV-VCA-IgM virkelig har en immunrespons på EBV-VCA. Dessuten er det interessant å dokumentere muligheten for at vi teoretisk kan ha en kryssreaksjon med VCA-IgG og RF. En kan også vurdere muligheten for hvorvidt det kan være en uspesifikk reaksjon som skyldes andre agens som ikke har noe med EBV å gjøre hvis VCA-IgG er negativ.

EBNA-1-IgG.

Jeg ønsker å teste alle prøvene i panelet da et positivt svar med stor sannsynlighet kan utelukke at pasientene har en akutt EBV-infeksjon. Negativt svar kan med stor sannsynlighet si at pasienten ikke tidligere er infisert med EBV. Positivt resultat tyder på at pasienten er infisert med EBV, og at infeksjonen trolig ligger en viss tid tilbake. Resultatene sier også noe om prevalensen i denne pasientgruppen med hensyn på gjennomgått EBV-infeksjon.

Rheumatoid faktor (RF).

Hvis vi har RF-interferens må nødvendigvis prøvene inneholde rheumatoid faktor. Jeg ville teste både de prøvene som er reaktive for EBV-IgM og de som ikke er det for å se om det er signifikant forskjell på forekomst av påvisbart nivå av RF i disse to gruppene. Det kunne dessuten være interessant å se hvor stor andel av pasienter med akutt HAV-infeksjon som har

høyt nivå av RF. Jeg er imidlertid usikker på hvor stor mengde det må være av RF for å gi positivt utslag på VCA-IgM-testen, dessuten må det være RF av IgM-type.

Total-IgG.

Jeg vil undersøke om det er signifikant forskjell på IgG-nivået enten prøvene er positive eller ikke for VCA-IgM. Hvis serum inneholder så mye IgG at anti-IgG i diluenten ikke klarer å fjerne alt, vil også en del av det spesifikke VCA-IgG være fritt og vil kunne bindes til antigen i brønnene. Hvis det i tillegg finnes RF i serum, er det mulig å få falsk positivt resultat som følge av RF-interferens. Referanseverdier for IgG i serum er 6 - 16 mg/ml, med større variasjoner for barn (35).

EBV-IgM med Enzygnost® EBV/IgM.

Som "gullstandard" velges ofte tester basert på immunfluoresens-prinsippet (IFA). Av praktiske grunner er ikke dette valgt her. Det har også tidligere vært beskrevet de samme problemene ved bruk av IFA (23, 24, 36, 37). Enzygnost-testen påviser IgM-antistoffer mot både VCA, EA og EBNA. Hvis det foreligger en reaktivering av latent virus eller B-lymfocytter, burde testen gi nokså like resultater som testen fra Gull. Har derimot Enzygnost-testen bedre spesifisitet, vil jeg forvente å få flere negative resultater for EBV-IgM.

EBV-IgG med Enzygnost® EBV/IgG.

Positiv test er forenlig med at pasienter er EBV-infisert, men sier ikke noe om infeksjonstidspunktet, da den ikke skiller mellom aktuell og tidligere infeksjon. Negativ test taler for at pasienten ikke er infisert med EBV.

RESULTATER

Alle resultatene er ført inn i tabell 1. Her har jeg i tillegg ført inn resultater for CMV-IgM og Paul-Bunnell-Davidsohns test der de er rutinemessig utført. To av de 76 prøvene var borte fra serumarkivet da den videre testingen startet, og en tredje prøve (102340/98) var borte da RF, total-IgG og EBV-Enzygnost-tester skulle utføres.

Av 74 testede prøver er 26 funnet positive for EBV-VCA-IgM og 48 negative (derav to mellom 90 og 100 % av cutoff). 66 av prøvene er positive for EBV-VCA-IgG, og 64 for EBNA-1-IgG. Resultatene er gruppert ut ifra antistoffmønster i tabell 3. Total-IgG ble analysert i 73 prøver, og 39 av dem hadde verdier over 15 g/l, dvs. over grensen for det som angis å kunne fjernes med anti-humant IgG i prøvefortynningsbufferen, mens 34 lå under (tabell 4). Av 58 prøver som ble testet for RF ble 2 (1,4 %) positive.

Ved litteratursøk fant jeg seks publikasjoner hvor det er vist en sammenheng mellom akutt hepatitt A-virus-infeksjon og reaktivitet i tester som kan indikere infeksjon med Epstein-Barr-virus (3, 23, 24, 36, 37, 38).

DISKUSJON

Prevalens av gjennomgått EBV-infeksjon.

Når det gjelder prevalens med hensyn på gjennomgått EBV-infeksjon (tabell 2) samsvarer funnene her med det som oppgis i litteraturen (10, 21). Materialet er imidlertid lite i de laveste aldersgruppene.

Primær EBV-infeksjon

I testpanelet har jeg funnet 20 prøver som er positive for VCA-IgM, VCA-IgG og EBNA-1-IgG (mønster +/+ /+) med testene fra Gull Laboratories. Det kan være forenlig med at en primærinfeksjon nylig kan ha funnet sted slik at EBV-IgM fortsatt er påvisbart, og at EBNA-

1-IgG har kommet tidlig. EBV-IgM er ofte påvisbart to til tre måneder etter symptomdebut, men kan av og til vare lenger. EBNA-1-IgG kan iblant påvises mens EBV-IgM ennå er påvisbart, men det virker nokså usannsynlig at det skulle gjelde for så mange pasienter. En av disse prøvene er rutinemessig undersøkt for heterofile antistoffer med Paul-Bunnell-Davidsohns test, og kunne slå positivt ut på denne testen hvis så skulle være tilfelle, men den er negativ (titer < 2, alder 33). Klinisk bilde og anamnese tyder på en akutt hepatitt A-sykdom, og det er lite sannsynlig at alle disse samtidig har en primær Epstein-Barr-virusinfeksjon.

I testpanelet er det fem prøver som er positive for VCA-IgM og negative for EBNA-1-IgG, og det kan ikke utelukkes at de har en primær EBV-infeksjon. De fleste primære EBV-infeksjoner forløper asymptomatisk, og ingen av de fem pasientene er i pubertetsalder, den alderen man oftest har symptomgivende sykdom. Klinikk og anamnese tyder imidlertid også her på en akutt hepatitt A og det er vel noe tvilsomt at de samtidig skulle ha en primær EBV-infeksjon. Tre av de fem prøvene er positive for VCA-IgG. Disse pasientene har alder 39, 35 og 27 år, det er ikke høyrisikogruppe for å få primær EBV-infeksjon, men det kan likevel ikke utelukkes. Det kunne tenkes at de egentlig har et visst nivå av EBNA-1-IgG, men at det er så lavt at testen har for dårlig sensitivitet til å fange dem opp. Imidlertid ligger ikke de avleste verdiene spesielt nær grenseverdien.

De andre to er negative for både VCA-IgG og EBNA-1-IgG, og disse pasientene har ikke gjennomgått EBV-infeksjon tidligere. For disse kan man nok utelukke at det positive VCA-IgM-svaret skyldes reaktivering eller RF-interferens, og en primærinfeksjon meget tidlig i forløpet er mulig, selv om pasientene tilhører en aldersgruppe hvor dette er sjelden (40 og 71 år).

En prøve som er negativ for VCA-IgG og positiv for både VCA-IgM og EBNA-1-IgG passer ikke inn på noe tidspunkt i forhold til en EBV-infeksjon. VCA-IgG ligger mellom 90 og 100 % av grenseverdi, det kan hende den egentlig skulle vært positiv, IgM er også lav, og prøveresultatene bør anses som inkonklusive.

Den positive prediktive verdien for EBV-VCA-IgM varierer for denne testen som for alle tester med insidens av sykdom i populasjonen. Den populasjonen som her er undersøkt består stort sett av en aldersgruppe hvor de fleste er tidligere infisert med EBV. Her vil da et enkeltstående positivt EBV-VCA-IgM-svar ha relativt lav prediktiv verdi med hensyn på primær EBV-infeksjon, og diagnostikken kan bedres ved å utføre flere analyser, som f. eks EBNA-1-IgG, eller aviditetstesting av EBV-VCA-IgG (17).

Reaktivering av latent EBV.

Prøvene med resultatmønster +/-+ (tabell 3) kan tolkes som en reaktivering av latent Epstein-Barr-virus eller av EBV-spesifikke B-celler, men det er vanskelig å få bekreftet, da det ikke finnes gode tester som spesifikt kan diagnostisere reaktivering av EBV. Jeg kunne ha testet for antistoff mot early antigen (anti-EA) da slike antistoffer som regel foreligger ved EBV-replikasjon, og de har vært antydning som markør for mulig reaktivering av EBV når det samtidig påvises EBNA-1 IgG (20). Moderat økte anti-EBV-VCA- og anti-EA-verdier er imidlertid sett ved mange tilstander som affiserer immunsystemet, og moderat økt anti-EA har ingen diagnostisk verdi (18). Sannsynligheten for at en HAV-infeksjon medfører en reaktivering av EBV er vanskelig å vurdere. Det foregår vanligvis en viss virusreplikasjon hos alle individer som tidligere har gjennomgått en EBV-infeksjon (latent infeksjon), men immunapparatet holder den i sjakk slik at det ikke gir sykdom. Hvis balansen mellom en latent EBV-infeksjon og immunmekanismene hos et individ blir endret enten ved sykdom

eller av iatrogene årsaker, kan EBV-assosiert sykdom oppstå (10), mens gjentatt EBV-sykdom er ytterst sjelden hos immunkompetente (38). Det er kjent at virusinfeksjoner kan svekke immunapparatet i større eller mindre grad, bl.a. morbilli-, HIV- og CMV-infeksjoner (1, 39). Gir så en HAV-infeksjon en svekkelse av immunsystemet? Søk i Medline/Pubmed gir en artikkel der dette antydes i sammendraget, men av språklige grunner (russisk) har jeg ikke gått dypere inn i dette (40). Hvis immunapparatet er noe svekket, oppstår en lett grad av reaktivering. Det innebærer at flere infiserte B-lymfocytter går over i lytisk syklus og produserer de aktuelle antigenene. Er immunresponsen likevel god nok, kan man tenke seg at virusreplikasjonen ikke gir sykdom med spesifikke kliniske symptomer. Organismen svarer med økt produksjon av antistoffer, det dannes da anti-VCA, anti-EA og ofte IgM-autoantistoffer mot enzymet triosefosfat-isomerase, anti-TPI. Anti-TPI er i stand til å indusere hemolyse, og det har vært påvist både ved akutt EBV-infeksjon og ved reaktivering av EBV (37). Det har også vært påvist EBV-spesifikke antistoffer ved akutt hepatitt A hvor en mener at det kan ha en sammenheng med reaktivering av EBV på grunn av samtidig påvist anti-TPI (23).

Polyklonal aktivering

Det kan tenkes at det foreligger en svak virusreaktivering som i likhet med en primær EBV-infeksjon har evne til å stimulere til polyklonal aktivering av B-celler lik den man iblant ser ved en akutt EBV-infeksjon. I en studie av en gruppe pasienter med ”serologisk EBV-reaktivering” ble det påvist andre IgM-antistoffer, både virusspesifikke og autoimmune, og det antydes at RF-interferens eller uspesifikk B-celleaktivering kan være årsak til mange av de positive resultatene. Diagnoser her er faryngitt/lymfadenitt, feber av ukjent årsak, hepatitt A, B, eller C, HIV/AIDS, ikke-HIV-relatert infeksjonssykdom samt non-viral leverlidelse, kollagen sykdom, malign lidelse, organtransplanterte osv. Her ser vi at det ikke er uvanlig å finne spor av EBV-reaktivering både ved ulike virusinfeksjoner og andre lidelser. Man konkluderer her med at ”serologisk EBV-reaktivering” ikke samsvarer med en synlig klinisk tilstand, men heller reflekterer en uspesifikk aktivering av immunsystemet (20).

I resultattabellen har jeg angitt resultater for CMV-IgM (ELFA/Vidas/Biomerieux) for de prøvene som rutinemessig ble testet for dette. Dette for å se på muligheten for hvorvidt vi har en polyklonal aktivering av B-celler. En undersøkelse i en norsk populasjon viser at prevalensen for gjennomgått CMV-infeksjon øker fra 50 % i 20-årsalder til 80 % ved 30-årsalder og opp mot 100 % fra 60-årsalderen (41). Da kan det være rimelig å anta at minst halvparten av pasientene i hepatitt A-materialet er seropositive. Dermed kunne en kanskje forvente påvisbare CMV-IgM-verdier hos noen av pasientene hvis en polyklonal aktivering er hyppig forekommende ved denne problemstillingen. 20 av prøvene som er positive for EBV-VCA-IgM er også undersøkt for CMV-IgM, men ingen blir positive, og bare to av dem har en verdi som ligger mellom 78 og 100 % av grensenivå for positivt svar. De to er blant de prøvene som har for høy absorbans i CoAg-brønner med Enzygnost-testen. En av dem er positiv og en annen har grenseverdi med Enzygnost. Totalt sett er det ikke holdepunkter for at polyklonal aktivering skulle være en betydelig årsaksfaktor ved vår problemstilling, men det kan ikke utelukkes i disse tre tilfellene. Jeg kunne også ha testet resten av prøvene for CMV, eller testet for IgM mot andre virus for å belyse dette nærmere.

Andre herpesvirus kan ha antigene epitoper som er så like epitoper på EBV at antistoffer mot dem vil kunne kryss reagere i en antistoff-test. Det kunne kanskje særlig gjelde for Herpes hominis-virus 8 (HHV 8), da det også tilhører subfamilien Gamma-herpesvirinae, og dermed har større likhet med EBV. Hvis det foreligger en polyklonal aktivering, kan man tenke seg at alle plasmaceller med spesifisitet for flere ulike herpesvirus stimuleres til å skille ut IgM. Det kan gi en uspesifikk binding i en mengde som gjør at testresultatet havner over cutoff.

Teoretisk behøver det da ikke å være EBV-IgM tilstede, hvis IgM med spesifisitet for andre herpesvirus også kan kryssreagere. Pasienten behøver ikke engang å ha gjennomgått EBV-infeksjon tidligere.

En ville ha mulighet til å finne tegn til polyklonal aktivering ved å teste for total IgM eller utføre en serumproteinelektroforese, men dette gjøres sjelden ved akutte hepatitter.

Det kan dessuten tenkes at det kan finnes signalstoffer som kan indusere en stimulering av EBV-spesifikke B-lymfocytter til EBV-antistoffproduksjon uten at det foreligger virusreplikasjon.

Kryssreaksjoner eller andre uspesifikke reaksjoner

Det kunne tenkes at årsaken til det vi finner er en kryssreaksjon mellom HAV- og EBV-antistoffer. EBV er imidlertid et herpesvirus mens HAV er et hepatovirus i familien picornaviridae. De er temmelig ulike, EBV er for eksempel membrankledd på overflaten, med glykoproteiner i membranen, mens HAV ikke har membran eller glykoproteiner i sin overflate. Det er da lite sannsynlig at de skulle ha antigene epitoper med noen likhet av betydning, de har altså ulike antigene egenskaper. Dermed er en kryssreaksjon mellom disse lite sannsynlig.

Kryssreaksjon med andre herpesvirus-antistoffer kan også foreligge uten at det skyldes polyklonal aktivering da virus innenfor denne gruppen har en del felles antigene egenskaper. Det er riktignok ikke så stor sannsynlighet for at spesifikke IgM-antistoffer kan påvises i blod hvis det ikke pågår en primær infeksjon, selv ved reaktivering av ulike herpesvirus kan det ofte ikke påvises IgM-antistoffer. Kryssreaksjoner kan imidlertid involvere ulike herpesvirus-IgG i kombinasjon med rheumatoid faktor.

Interferens med rheumatoid faktor og EBV-IgG-antistoffer.

Reaksjonsbrønnen i testen vår er dekket med EBV-VCA som kan binde både IgM og IgG. Hvis pasienten tidligere har gjennomgått en EBV-infeksjon, og dermed har EBV-VCA-IgG i serum som resultat av dette, bindes det til antigen i brønnen. Hvis pasienten har RF av IgM-type i serum kan de bindes til IgG som er bundet til brønnene, og enzymmerket anti-IgM-konjugat bindes til bundet RF såvel som til (eller istedenfor) spesifikt EBV-VCA-IgM-kompleks. For å hindre slik binding inneholder prøvefortynningsbufferen en absorbent som skal fjerne IgG. Produsenten av VCA-IgM-testen angir at denne bufferen skal inneholde antihuman-IgG i en mengde som kan nøytralisere opp til 15 mg/ml av humant IgG (28). Spørsmålet blir da om absorberingen har vært god nok.

Jeg hadde én reagensflaske med RF-reagens, og det ble nok til kun 58 tester. Jeg valgte å teste alle prøvene som var reaktive for VCA-IgM samt et tilfeldig utvalg av de resterende prøvene. Kun to av prøvene var reaktive. Begge hadde total-IgG høyere enn 15 g/l (15,8 og 17,4 g/l). De hadde EBV-IgM-resultater med hhv. Gull/Enzygnost: neg/185 % og 188 %/neg, den siste med for høy absorbans i CoAg-brønnen. I litteratur er det nevnt at en ofte kan finne høye nivåer av RF ved akutt viral hepatitt. Det er tilsynelatende ingen tydelig forekomst av høye RF-verdier blant disse prøvene, men deteksjonsgrensen er angitt å være så høy som 20 IU/ml. Det er imidlertid godt mulig at prøvene inneholder RF i mindre mengder som likevel kan gi interferens i disse prøvene. Det har vært vist at sera som inneholder RF ned mot 0,5 IU/ml kan gi falske EBV-IgM resultater i ELISA-test (4). For å kunne si om det er tilfelle her, måtte nivået av RF vært målt mer nøyaktig.

Det kunne være interessant å se om avlest verdi for VCA-IgG er høyere for de prøvene som er positive for VCA-IgM enn for de som er negative. Gjennomsnittsverdi av VCA-IgG for de positive (mønster +/+) er 314 % av cutoff, mens for de negative (mønster -/+) er 262 %. Det er vanskelig å få så mye ut av dette, da absorbansen i mange tilfeller ligger over deteksjonsgrensen, og mange av de angitte verdiene for VCA-IgG i tabell 1 egentlig er ”større-eller-lik”-verdier. Dermed er de sanne gjennomsnittsverdiene egentlig høyere enn utregnet. Det er mulig at det er tilfelle i størst grad for de VCA-IgM-positive prøvene, slik at forskjellen er enda større, men det blir egentlig bare spekulasjoner. I tillegg er metoden kvalitativ, og avlest verdi svarer ikke direkte til et bestemt antistoffnivå.

Vi har 39 prøver med total-IgG over og 34 prøver under 15 g/l (ratio 1,1). Når det gjelder de VCA-IgM-positive testene ser vi at 17 prøver har total-IgG over, mens 7 ligger under 15 g/l (ratio $17/7 = 2,4$). Til sammenligning er ratio for de negative prøvene $20/27 = 0,7$. Med Enzygnost er tilsvarende ratioer henholdsvis 1,6 og 1,7. Det kan tyde på at testen fra Gull har en svakhet når det gjelder fjerning av IgG som gir falsk reaktivitet. Årsaken kan ligge i selve prøvefortynningsbufferen, ved at den inneholder for lite anti-humant IgG, men problemet kan også skyldes dårlig blanding av serum og fortynningsbuffer, eller kanskje blandingen burde inkuberes en stund før tilsetning i reaksjonsbrønn?

Sensitivitet og spesifisitet

Er cutoff satt for lavt i VCA-IgM-testen? Den beregnes på grunnlag av målt verdi for et referanseserum som følger med testpakken, og den har lov til å variere innenfor et relativt stort måleområde som for alle reagenspakker uavhengig av nummer på produksjonsenheten har grenseverdiene 0,200 – 1,000 (avlest optisk tetthet). I laboratoriet brukes en intern kontroll som består av et positivt serum fortynnet i et negativt serum slik at verdien ligger like over cutoff. Den kjøres i hvert oppsett, og varierer lite innenfor hver produksjonsenhet. For de produksjonsenheter hvor referanseserum har en verdi nær nedre grense (0,200) har vi imidlertid sett at internkontrollen har høyere verdi i forhold til cutoff enn for de produksjonsenheter hvor referanseserum, og dermed cutoff, har høy verdi (nær 1,000). Det er da også rimelig å anta at det samme gjelder for serumprøver som analyseres. Det trenger ikke nødvendigvis å ha noe å si for prøver som har verdier under cutoff, og for reproduktibiliteten med hensyn på reaktivitet. Likevel vil det sannsynligvis være de prøvene som ligger i et grenseverdiområde som kan bli reaktive eller negative alt etter referanseserumets nivå. Er cutoff lav, øker sensitiviteten, men risikoen for falske positive resultater øker. Lave positive verdier for EBV-VCA-IgM bør generelt tolkes med forsiktighet. Ved laboratoriet har vi på grunnlag av erfaring med testen og intern konsensus definert et område ved 100-130 % av cutoff. Her konkluderer vi med grenseverdi av usikker klinisk betydning, og verdien må være høyere enn 130 % for at resultatet er forenlig med aktuell/nylig infeksjon. I dette materialet har kun to av prøvene grenseverdi, mens 24 er over 130 %.

En uspesifikk reaksjon med binding av immunkomplekser ved hjelp av komplement er beskrevet. Disse immunkompleksene er foreslått å bindes til reseptorseter på EBV-transformerte celler i testen som her er en immunfluoresenstest (36). Brønnene i testplaten i Gull-testen er dekket med rensset EBV-VCA gp 125 fra P3HR-1-celler. Det er vanskelig å vite om antigenet i Gull-testen er rensset godt nok til at slike nedslag ikke kan finne sted, men trolig er det mindre av slike reseptorseter i vår test enn i en IF-test der hele celler benyttes. Rekombinante proteiner og peptider er for øvrig lettere å standardisere enn antigener som er dyrket i celler (42).

Antall prøver som er negative for VCA-IgM er 48. Hvis vi betrakter alle sera i gruppe 1, 4, 5, 7 og 8 (til sammen 66 stykker) som sant negative med hensyn på aktuell primær EBV-

infeksjon og ser at 45 av disse er negative for VCA-IgM-testen fra Gull, gir det en spesifisitet på $45/66 = 0,68$ for denne testen i denne populasjonen. Settes cutoff høyere øker spesifisiteten, men en risikerer å miste tilfeller av primær EBV-infeksjon hvor antistoffresponser ikke er så sterk. Spesifisiteten for EVB-IgM-testing alene er lav, mens spesifisiteten for en kombinasjon av testing for EBV-VCA-IgM, EBV-VCA-IgG og EBNA-1-IgG er betydelig høyere. Dette fordi en positiv EBNA-1 IgG innebærer stor sannsynlighet for at primærinfeksjonen ligger lenger tilbake i tid i forhold til tidspunktet for det aktuelle sykdomsforløpet.

Det kan synes som om sensitiviteten til EBNA-1-IgG-testen er noe dårlig, siden vi har flere prøver som er negative for dette som samtidig er positive for VCA-IgG og for EBV-IgG med Enzygnost-testen. Andre har også funnet lav sensitivitet for denne testen (43). Dette er imidlertid vanskelig å vurdere her da vi egentlig ikke vet hva som er "sant resultat".

Ifølge produsenten av Enzygnost-testene kan positiv EBV-IgM sammen med positiv IgG tyde på nylig infeksjon. Produsenten hevder også at muligheten kan være til stede for at både infeksjon med andre patogener og andre faktorer kan indusere produksjon av spesifikt EBV-IgM, og nevner CMV, malaria, visse gram negative bakterier, HIV, mykoplasma, lymfokiner og revmatoide lidelser. Det hevdes dessuten at ved funn av spesifikt IgM mot hepatitt A-, morbilli- eller rubellavirus er en reaktiv EBV-IgM-test et tegn på polyklonal stimulering av B-celler som gir en multipl immunrespons (33).

Sammenligning av testene

Sammenligning av resultatene for Gull og Enzygnost (tabell 5) ga ingen indikasjon på at den ene testen var klart bedre enn den andre. Det er dessuten vanskelig å vurdere resultatene da prøvene ikke samtidig er undersøkt med en "gullstandard". Enzygnost ga færre positive svar, dette må sees på som en fordel, tatt i betraktning at pasientene trolig ikke har en akutt EBV-infeksjon. Det viste seg imidlertid at 7/13 (67 %) av de prøvene som ble positive var negative med testen fra Gull. Vi har i tillegg svært mange resultater – 36/73 (49 %) – som konkluderes med ekvivokale, og retesting kreves. Dette er et minus med denne testen, da det er mer arbeidskrevende å vurdere både for de som utfører analysen, og for rekvirenten som mottar et svar som ikke konkluderer med hensyn på aktuell EBV-infeksjon, og som må vurdere å ta nye prøver av pasienten. For å se hvor stor andel av prøvene som fikk samme resultat med begge testene for EBV-IgM, kan konkordansen beregnes, og har en verdi på 0,27 (20/73). De positive resultatene utgjorde ca 1/3 av dette, og de negative ca 2/3. Testene er imidlertid ikke helt sammenlignbare, da Enzygnost-testen påviser både VCA-, EA- og EBNA-IgM, mens testen fra Gull kun påviser VCA-IgM.

16 prøver er negative for IgM med Enzygnost-testen, og det gir en spesifisitet på $16/65 = 0,25$ hvis vi betrakter ovenfor nevnte gruppe som sant negative (En av de 66 ble ikke testet med Enzygnost-testene). Selv om en undersøker for EBV-IgG, er nytteverdien av Enzygnost-testene imidlertid begrenset, da IgG-testen ikke skiller mellom VCA-, EA- og EBNA-antistoffer. Testen skiller dermed ikke mellom primær og tidligere infeksjon. Det er imidlertid interessant å se at alle de fire seraene som er negative for EBV-IgG med Enzygnost er de samme fire som er negative for både VCA-IgG og EBNA-IgG med Gulls tester. Av de to prøvene som har mønster +/- med Gull sin test, er den ene -/-, mens den andre er inkonklusiv/- med Enzygnost (IgM/IgG). Det er for få prøver til at en dermed kan si at Enzygnost sin EBV-IgG-test har god spesifisitet, og en kan heller ikke vite om det er antistoffer mot VCA, EBNA, EA eller kombinasjoner av dem som gir reaktiviteten. Slår en sammen resultatene for VCA- og EBNA-IgG, er det fullt samsvar mellom IgG-testene, det vil

si at de prøvene som er positive for IgG med Enzygnost, også er positive for VCA-IgG og/eller EBNA-IgG med Gulls tester.

Interessant nok hadde svært mange – 19/24 (79 %) – av de prøvene som ble positive med Gulls VCA-IgM-test høy bakgrunnsverdi med Enzygnost-testen. Dette vises ved flagging av en høy verdi i CoAg-brønnen. Tilsvarende hadde kun 2/47 (4 %) av de negative prøvene så høy bakgrunnsverdi. Disse funnene var jevnere fordelt ved med Enzygnost-testen, blant prøver som ble positive (6/13 – 46 %), hadde grenseverdi/ekvivokal verdi (7/36 – 19 %) eller ble negative (8/24 – 33 %). Av de reaktive (Gull) som ikke ble flagget ut med for høy verdi i CoAg-brønnen (Enzygnost), ligger verdiene også relativt høyt i CoAg-brønnen i forhold til det som sees ved tilsvarende reaktive tester for andre agens. Jeg har ikke ut fra pakningsvedlegget klart å finne ut hva øvre ”tillatte”grense for avlest verdi i CoAg-brønnen er, men det ser ut som om den ligger på en avlest absorbanse rundt 0,300. Det kan se ut som om det bindes stoffer i CoAg-brønnen som er ansvarlige for en uspesifikk reaktivitet i serum, og som denne testen har en viss evne til å kontrollere for som ikke testen fra Gull har.

FEILKILDER

I en slik retrospektiv undersøkelse vil det være mange unøyaktigheter, blant annet med hensyn til prøvematerialet. Vi har ingen garanti for hvordan prøven er tatt/oppbevart før ankomst til vårt laboratorium. Noen prøver fra serumarkivet kan også ha vært tint/frosset flere ganger før de ble plukket frem til denne undersøkelsen. Analysering med Gulls VCA-IgM-test (for mange av prøvene)og VCA-IgG (for noen av prøvene) ble utført i løpet av tidsrommet januar 1998 – april 1999 av flere personer og med ulike reagensbatcher hvor cutoff varierer en del. Mange betingelser er veldig varierende av den grunn, og det gjør en direkte sammenligning av testene for EBV-IgM usikker. Prøvene er heller ikke analysert med noen ”gullstandard” til sammenligning, slik at det er vanskelig å vite hva som egentlig er de mest ”sanne” resultatene.

KONKLUSJON

Serumprøver fra 76 pasienter med kliniske og serologiske (hepatitt A-virus IgM-antistoff positive) funn forenlige med hepatitt A ble testet for antistoffer mot Epstein-Barr-virus (EBV). 26 av prøvene ble positive for EBV-VCA-IgM, og 21 av disse ble positive for anti-EBNA-1-IgG. 71 % av de EBV-IgM-positive hadde total-IgG i serum over øvre referansegrense, mens kun 43 % av de negative hadde det. Ved undersøkelse med en annen test for EBV-IgM fant jeg lav konkordans.

Det er liten sannsynlighet for at den reaktiviteten vi ser i EBV-VCA-IgM-testen skyldes primær EBV-infeksjon, eller kryssreaksjon med hepatitt A-virus-IgM. Polyklonal aktivering med produksjon av spesifikke EBV-antistoffer såvel som antistoffer mot andre herpesvirus kan ikke utelukkes, men jeg ville ha forventet at noen prøver hadde vært positive for CMV-IgM. Reaktivering av EBV og EBV-spesifikke B-celler kan se ut til å være sannsynlige årsaker, det har også andre forfattere antydnet. Den høyere forekomsten av forøket total-IgG blant de VCA-IgM-positive prøvene gir også sterk mistanke om at dårlig fjerning av IgG i serum gir kryssreaksjon via RF. Det kan imidlertid være ulike årsaker som gir de reaktive resultatene i de ulike serumprøvene.

Et enkeltstående positivt EBV-VCA-IgM-svar har relativt dårlig prediktiv verdi med hensyn til primær EBV-infeksjon i en populasjon som denne. For å konkludere med hvorvidt et positivt EBV-VCA-IgM-svar tyder på en primær EBV-sykdom, er det nødvendig at man samtidig undersøker for VCA-IgG og EBNA-1-IgG. Hvis tolkningen av resultatene likevel er

usikker eller stemmer dårlig med klinisk bilde, er det viktig å foreta en bredere utredning for å utelukke andre virusinfeksjoner eller eventuelt andre sykdommer.

REFERANSER:

1. Aalto SM, Linnavuori K, Peltola H, Vuori E, Weissbrich B, Scubert J et al: Immunoreactivation of Epstein-Barr virus due to cytomegalovirus primary infection. *J Med Virol* 1998; 56: 186-91.
2. Weber B, Brunner M, Preiser W, Doerr HW: Evaluation of 11 enzyme immunoassays for the detection of immunoglobulin M antibodies to Epstein-Barr virus. *J Virol Methods* 1996; 57: 87-93.
3. Gray JJ, Caldwell J, Sillis M: The rapid serological diagnosis of infectious mononucleosis. *J Infect* 1992; 25: 39-46
4. Ho DW, Field PR, Cunningham AL: Rapid diagnosis of acute Epstein-Barr virus infection by an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for specific immunoglobulin M (IgM) antibody without rheumatoid factor and specific IgG interference. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 952-8.
5. Degré M: Virus som forårsaker hepatitt. I: Degré M, Hovig B, Bukholm G, Rollag H: *Medisinsk mikrobiologi*. ISBN 82-00-45056-2, Gyldendal Norsk Forlag AS, Oslo 2000 s 319-22.
6. Cann, Alan: *Principles of molecular virology*. ISBN 0-12-158533-6, Academic Press 2001.
- 6b. Harrison HJ et al: Hepatitis A. I: Zuckerman AJ, Banatvala JE, Pattison JR, Griffiths PD, Schoub BD: *Principles and practice of clinical virology*. ISBN 0-470-84338-1, John Wiley & Sons, Ltd., London 2004 s 201-207.
7. Smittevernhandboka [Hjemmeside på internett], Oslo: Folkehelseinstituttet [oppdatert 03.12.2003, sitert 10.12.2004], tilgjengelig fra: <http://www.fhi.no>.
8. MSIS statistikk [Database på internett], Oslo: Folkehelseinstituttet [oppdatert 10.12.2004, sitert 10.12.2004], tilgjengelig fra: <http://www.fhi.no>.
9. Rollag H: Epstein-Barr-virus. I: Degré M, Hovig B, Bukholm G, Rollag H: *Medisinsk mikrobiologi*. ISBN 82-00-45056-2, Gyldendal Norsk Forlag AS, OSLO 2000 s 313-6.
10. Crawford DH: Epstein-Barr virus. I: Zuckerman AJ, Banatvala JE, Pattison JR, Griffiths PD, Schoub BD: *Principles and practice of clinical virology*. ISBN 0-470-84338-1, John Wiley & Sons, Ltd., London 2004 s 123-146.
11. Anagnostopoulos I, Hummel M, Kreschel C, Stein H: Morphology, immunophenotype, and distribution of latently and/or productively Epstein-Barr virus-infected cells in acute infectious mononucleosis: implications for the interindividual infection route of Epstein-Barr virus. *Blood* 1995; 85: 744-50.
12. Geyman JP, Erickson S. The ampicillin rash as a diagnostic and management problem: case reports and literature review. *J Fam Pract* 1978; 7: 493-6.
13. Gutiérrez J, Rodríguez M, Maroto C, Piédrola G: Reliability of four methods for the diagnosis of acute infection by Epstein-Barr virus. *J Clin Lab Anal* 1997; 11: 78-81
14. Linderholm M, Boman J, Juto P, Linde A: Comparative evaluation of nine kits for rapid diagnosis of infectious mononucleosis and Epstein-Barr virus-specific serology. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 259-61.

15. Bruu AL, Hjetland R, Holter E, Mortensen L, Natås O, Petterson W et al: Evaluation of 12 commercial tests for detection of Epstein-Barr virus-specific and heterophile antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000; 7: 451-6.
16. Jenson HB, Ench Y: Epstein-Barr virus. I: Rose NR, Hamilton RG, Detrick B: *Manual of clinical laboratory immunology*. ISBN 1-55581-215-5, ASM press, Washington 2002, s 618.
17. Robertson P, Beynon S, Whybin R, Brennan C, Vollmer-Conna U, Hickie I et al: Measurement of EBV-IgG anti-VCA avidity aids the early and reliable diagnosis of primary EBV infection. *J Med Virol* 2003; 70: 617-623.
18. Linde A: Diagnosis of Epstein-Barr virus-related diseases. *Scand J Infect Dis Suppl* 1996; 100: 83-88
19. Henle W, Henle G, Andersson J, Ernberg I, Klein G, Horwitz CA et al. Antibody responses to Epstein-Barr virus-determined nuclear antigen (EBNA)-1 and EBNA-2 in acute and chronic Epstein-Barr virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 570-574.
- 19b Rea TD, Ashley RL, Russo JE, Buchwald DS: A systematic study of Epstein-Barr virus serologic assays following acute infection. *Am J Clin Pathol* 2002; 117: 156-161
20. Obel N, Høier-Madsen M, Kangro H: Serological and clinical findings in patients with serological evidence of reactivated Epstein-Barr virus infection. *APMIS* 1996; 104: 424-8.
21. Myhr KM, Riise T, Barrett-Connor E, Myrnes H, Vedeler C, Grønning M et al: Altered antibody pattern to Epstein-Barr virus but not to other herpesviruses in multiple sclerosis: a population based case-control study from western Norway. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998; 64: 539-42.
22. Carson A, Pojen PC, Kipps TJ: New roles for rheumatoid factor. *J Clin Invest* 1991; 87: 379-383.
23. Naveau S, Delfraissy JF, Poitrine A, Poynard T, Chaput JC: Simultaneous detection of IgM antibodies against the hepatitis A virus and the viral capsid antigen of Epstein-Barr virus in acute hepatitis. *Gastroenterol Clin Biol* 1985; 9: 109.12.
24. Fikar CR, Mckee MD: False positivity of IgM antibody to Epstein-Barr viral capsid antigen during acute hepatitis A infection. *Pediatric Infect Dis J* 1994; 13: 413-4.
25. Echevarria JM, Sainz C, De Ory F, Najera R: Evaluation of commercial methods of enzyme immunoassay (EIA) for the measurement of rubella-specific IgM. *J Virol Methods* 1985; 11: 177-187.
26. Verkooyen RP, Hazenberg MA, Van Haaren GH, Van Den Bosch JM, Snijder RJ, Van Helden HP et al: Age-related interference with Chlamydia pneumoniae microimmunofluorescence serology due to circulating rheumatoid factor. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1287-90
27. Pakningsvedlegg: HAVAB-M™ 2.0, AxSYM, Abbott, revidert desember 1997
28. Pakningsvedlegg: EBV VCA IgM ELISA, Gull Laboratories,
29. Pakningsvedlegg: EBV VCA IgG ELISA, Gull Laboratories, revidert januar 1998
30. Pakningsvedlegg: EBNA-1 IgG ELISA, Gull Laboratories,
31. Pakningsvedlegg: Rapi-Tex® RF, DADE Behring, utgave av juni 1998
32. Pakningsvedlegg: Antisera mot human IgG, DADE Behring, utgave av april 1998
33. Pakningsvedlegg: Enzygnost® Anti EBV/IgM, DADE Behring, utgave av april 1998
34. Pakningsvedlegg: Enzygnost® Anti EBV/IgG, DADE Behring, utgave av april 1998
35. Referanseverdier for klinisk kjemisk avdeling, SiA 1996.
36. Freymuth F, Foucaut P, Quibriac M, Petitjean J, Ajchenbaum F, Pujol M: Anti-Epstein-Barr virus IgM antibodies in viral hepatitis A and B: significance and prevention. *Gastroenterol clin biol* 1986; 10: 441-2

37. Ritter S, Schröder S, Uy A, Ritter K: Haemolysis in hepatitis A virus infections coinciding with the occurrence of autoantibodies against triosephosphate isomerase and the reactivation of latent persistent Epstein-Barr virus infection: *J Med Virol* 1996; 50: 272-5
38. Andersson J: Clinical and immunological considerations in Epstein-Barr virus-associated diseases. *Scand J Infect Dis Suppl* 1996;100: 72-82
39. Degré M: Virusinfeksjonenes patogenese. I: Degré M, Hovig B, Bukholm G, Rollag H: *Medisinsk mikrobiologi*. ISBN 82-00-45056-2, Gyldendal Norsk Forlag AS, Oslo 2000 s 283.
40. Balikin VF, Sukharev VM: Clinically conditional variants of the immune response in viral hepatitis A and B in children. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 1989; 10: 35-9.
41. Skar AG, Hoddevik G: Prevalence of cytomegalovirus antibodies in Norwegian kidney-transplant recipients and their living donors. A comparative study of two different methods. *APMIS* 1984; 92: 1-5.
42. Linde A: Epstein-Barr virus. I: Murray PR et al: *Manual of clinical microbiology*. ISBN: 1-55581-255-4, ASM Press, Washington 2003 s 1334.
43. Svahn A, Magnusson L, Jägdahl L, Kahlmeter G, Linde A: Evaluation of three commercial enzyme-linked immunosorbent assays and two latex agglutination assays for diagnosis of primary Epstein-Barr virus infection. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2728-32.

TABELLER

Tabell 1: Alle måleresultater i undersøkelsen.

Prøvenr	Alder	HAV-IgM	EBV-VCA-IgM	EBV-VCA-IgG	EBNA-1-IgG	RF	Total-IgG	Dade Behring Enzygnost IgM	IgG	CMV-IgM	PBD
1998											
100037	1	328	-	+ 336	+ 341		13,1	- 58	+ 421		
100557	3	230	+ 133	+ 238	+ 409	-	15,5	- 88 *	+ 431		
100668	3	274	-	+ 336	+ 368	-	15,7	+ 835	+ 323		
101245	1	304	108 gr	+ 312	+ 351	-	16,1	g 178	+ 617	-	
101382	3	306	-	+ 241	+ 409	-	22,3	- 85	+ 1227		
101713	2	301	-	+ 246	+ 409		17,1	- 85	+ 332		
101767	3	411	-	+ 251	- 76	-	14,4	g 135	+ 779	-	4
101794	1	298	-	+ 243	+ 283	-	13,6	g 111	+ 359	-	
102340	2	282	-	+ 321	+ 111		borte			-	8
103230	1	387	-	- 36	- 31		13,1	g 105	- 50		
103327	3	416	-	+ 303	+ 263		16,9	- 54	+ 493	-	2
103516	1	382	-	+ 239	- 23		10,9	g 110	+ 250		
103518	1	332	-	+ 277	+ 197	-	16,6	g 176	+ 459		
104239	3	294	-	+ 332	+ 379		12,3	- 68	+ 587	-	<2
104260	3	347	-	+ 182	+ 302	-	12,9	g 118	+ 708	-	<2
104842	3	316	-	+ 253	+ 325	-	20,3	+ 204	+ 624	-	<2
105647	1	415	-	- 14	- 15	-	8,8	+ 306	- 57		
106047	3	402	-	+ 309	+ 409	-	19,2	g 109	+ 374		
106606	3	105	-	- 81	+ 202	-	16,7	g 134	g 147		
107384	3	203	+ 334	+ 125	+ 295	-	12,8	+ 424 *	+ 310	grv93	<2
107730	2	358	-	+ 177	+ 232	-	13,1	g 168	+ 229		
109459	3	458	+ 135	- 45	- 27		13,1	- 5	- 23	-	<2
110465	3	471	-	+ 336	+ 409	-	14,4	g 167	+ 592	-	
110517	3	357	+ 258	+ 336	+ 337	-	14,5	g 129 *	+ 1512		
111685	3	391	-	+ 294	+ 409	-	16,8	- 95	+ 294		
112980	3	526	-	+ 298	+ 302	-	13,0	g 139	+ 398		
114295	3	411	-	- 19	+ 227		7,4	- 86	g 109		
115083	3	350	+ 332	+ 399	+ 344	-	18,0	- 97 *	+ 601	-	
115187	3	371	-	+ 336	+ 409		14,9	+ 336	+ 619		
115819	3	413	-	+ 260	+ 370	-	13,1	g 115	+ 536	-	
115851	3	355	+ 356	+ 336	+ 409	-	15,4	g 105 *	+ 1384		
115981	3	336	-	+ 336	+ 221	-	16,5	g 174	+ 830		
115982	3	355	-	+ 239	+ 354	-	22,9	g 141	+ 230		
115983	3	319	-	+ 233	+ 365	-	15,1	g 147	+ 72+		
116049	3	377	-	+ 325	+ 397	-	21,2	- 87	+ 574	-	
116126	1	425	-	+ 312	+ 409	-	16,6	g 154	+ 431		
116255	3	398	-	- 37	+ 313		16,7	- 75	+ 384		
116628	3	496	+ 573	+ 336	+ 409	-	12,7	- 0,032 *	+ 2234	-	
116906	3	667	- inko	+ 172	+ 392	-	9,3	g 179	+ 467	-	
116991	3	617	+ 316	+ 312	+ 228	-	20,0	+ 213	+ 644	-	
117310	3	648	-	+ 209	+ 340	-	12,6	- 92	+ 516		

117503	3	588	+ 512	+ 315	+ 409	-	19,3	g 134 *	+ 791	grv99	
117922	3	468	-	+ 291	+ 336	-	10,4	g 137	+ 788	grv88	
119378	3	616	+ 545	+ 271	+ 275	-	10,5	- 82 *	+ 1406	-	
119416	3	633	-	+ 165	+ 328		14,7	- 88	+ 892		
1999											
100057	3	423	+ 636	+ 212	+ 409	-	17,8	g 153 *	+ 694	-	
100058	3	553	+ 196	+ 245	+ 104	-	7,7	g 145 *	+ 420	-	
100429	3	630	-	+ 104	+ 409	-	14,7	g 125	+ 470	-	
100458	3	504	+ 466	+ 226	+ 116	-	18,4	- 56 *	+ 499	-	
100771	3	658	+ 276	+ 490	+ 232	-	18,3	- 69 *	+ 674	-	
Prøvenr	Alder	HAV-IgM	EBV-VCA-IgM	EBV-VCA-IgG	EBNA-1-IgG	RF	Total-IgG	DADE Behring Enzygnost IgM IgG		CMV-IgM	PBD
100983	3	466	- inko	+ 184	+ 379	-	12,8	g 183	+ 1369	-	
101157	3	317	+ 134	+ 468	- 33	-	16,5	+ 337	+ 680	-	
101381	3	393	+ 310	-	- 31		16,5	g 168	- 36	-	
101451	2	128	-	+ 263	+ 157	+	15,8	g 185	+ 1256		
101757	1	424	-	+ 305	+ 409	-	13,4	g 183	+ 910	-	
101977	3	282	-	+ 149	+ 409		12,0	g 113	+ 666		
102006	3	437	+ 188	+ 306	+ 334	+	17,4	- 87 *	+ 1086		
102060	3	434	+ 236	+ 674	- 51	-	19,0	g 163 *	+ 888	-	
102580	2	415	111 gr	- inko	+ 368	-	17,2	g 189	+ 393	-	
102664	2	380	+ 210	+ 145	+ 409	-	15,1	+ 285	+ 221	-	
102752	3	383	- inko	+ 136	+ 409	-	12,9	+ 572 *	+ 664	-	
103131	3	457	-	+ 332	+ 195	-	12,9	g 154	+ 675		
104005	3	371	-	+ 336	+ 409	-	16,1	+ 258	+ 1030	-	
104182	3	351	-	+ 336	+ 409		16,4	- 94	+ 984	-	
104185	2	426	-	+ 104	+ 368	-	10,6	+ 241	+ 756	-	
104266	3	108	-	+ 336	+ 368		16,8	- 98	+ 994		
104286	2	237	-	+ 336	+ 409		18,4	- 88	+ 3427	-	
104357	3	419	-	+ 199	+ 409	-	10,2	g 184	+ 315	-	
104540	3	505	-	+ 226	- 14	-	11,4	+ 206	g 195	-	
105648	3	570	+ 188	+ 312	- 21	-	18,0	+ 202 *	+ 516	-	
105741	2	546	+ 282	+ 336	+ 371	-	16,5	g 150 *	+ 252	-	
106062	3	483	+ 248	+ 310	+ 409	-	11,3	g 162 *	+ 818	-	
106348	3	492	+ 166	+ 336	+ 372	-	15,6	- 76 *	+ 807		
106629	3	436	+ 210	+ 265	+ 409	-	17,0	+ 241 *	+ 573	-	

HAV-IgM = IgM-antistoff mot hepatitt A-virus; VCA-IgG = IgG-antistoff mot Epstein-Barr-virus-kapsid-antigen; VCA-IgM = IgM-antistoff mot Epstein-Barr-virus-kapsid-antigen; EBNA IgG = IgG-antistoff mot Epstein Barr nukleært antigen-1; RF = reumatoid faktor; Enzygnost-testene påviser VCA-, EA- og EBNA-antistoffer i samme test; CMV-IgM = IgM-antistoff mot cytomegalovirus. Alder er relatert til gruppeinndelingen i tabell 2.

Resultater for HAV-IgM, VCA-IgM, CMV-IgM og Enzygnost-testene er angitt i % av cutoff, og total-IgG i g/l.

Inko = inkonklusiv, dvs. mellom 90 og 100 % av grenseverdi, angitt av produsent.

gr = grenseverdi (Område som brukes ved avdelingen, dvs. 100 – 130 % av cutoff.)

g = innenfor det område som tolkes som ekvivokal ved Enzygnost-testene, 100-200 %.

grv = grenseverdi (Område mellom 78 og 100 % av grenseverdi, angitt av produsent.)

* = absorbans i CoAg-brønner er høyere enn tillatte grense.

PBD = Paul-Bunnell-Davidsohns test for heterofile antistoffer.

Tabell 2: Aldersdifferensiert prevalens

Alder	Gruppe	Antall	VCA-IgG +	Prev.	EBNA-1-IgG +	Prev.	VCA- og/eller EBNA-1-IgG +	Prev.
-------	--------	--------	-----------	-------	--------------	-------	----------------------------	-------

< 13 år	1	10	8/10	80 %	7/10	70 %	8/10	80 %
13-24 år	2	8	7/8	88 %	8/8	100 %	8/8	100 %
> 25 år	3	56	51/56	91 %	49/56	88 %	54/56	96 %
Totalt		74	66/74	89 %	64/74	86 %	70/74	95 %

Tabell 3: Mulige tolkninger av ulike EBV-antistoffmønstre med testene fra Gull:

Gruppe	Mønster	Antall pasienter	Tolkninger
1	+/+/+	20	Reaktivering? RF-interferens? Primær EBV-infeksjon, rekonvalesensfase?
2	+/-/-	2	Aktuell primær EBV-infeksjon mulig. (Tidlig i forløp)
3	+/+/-	3	Aktuell primær EBV-infeksjon mulig. RF-interferens?
4	+/-/+	1	Inkonklusiv?
5	-/+/+	40	Tidligere EBV-infisert.
6	-/+/-	3	Primær EBV-infeksjon mulig.
7	-/-/+	3	Tidligere EBV-infisert? Inkonklusiv?
8	-/-/-	2	Ikke EBV-infisert verken nå eller tidligere.

Mønster betegner reaktivitet eller nonreaktivitet for VCA-IgM/VCA-IgG/EBNA-1-IgG.

Tabell 4: Sammenligning av resultater for EBV-IgM og total-IgG for testene fra Gull og Enzygnost:

		Total-IgG			
		> 15 g/l n = 39		< 15 g/l n = 34	
EBV-IgM Gull	24 pos	17/24 (71 %)	13*	7/24 (29 %)	6*
	2 grense	2/2 (100 %)		0	
	47 neg	20/47 (43 %)	1*	27/47 (57 %)	1*
EBV-IgM Enzygnost	13 pos	8/13 (62 %)	4*	5/13 (38 %)	2*
	36 grense	16/36 (44 %)	4*	20/36 (56 %)	3*
	24 neg	15/24 (63 %)	6*	9/24 (37 %)	2*

Tall + * angir det antall prøver i gruppen som fikk for høy verdi i CoAg-brønner i Enzygnost-testen.

Tabell 5: Sammenligning av resultater for EBV-VCA-IgM-testen fra Gull Laboratories vs. Enzygnost EBV-total-IgM

		Enzygnost EBV-IgM			
		13 pos		36 gren	
Gull EBV-VCA-IgM	24 pos	6	4*	9	7*
	2 gren	0		1	
	47 neg	7	2*	26	14

For testen fra Gull er de grenseverdiene (gren) som brukes ved avdelingen 100-130 % av cutoff. Enzygnost-testen har et bredere grenseverdi-område (100-200 % av cutoff). Tall + * angir antall prøver i gruppen som har for høy verdi i CoAg-brønner ved Enzygnost-testen.